

4

Interação de Norfloxacin com surfactantes iônicos

4.1

Interação de Norfloxacin com SDS

Apresentaremos, a seguir, resultados de absorção UV-vis, fluorescência estacionária e decaimento de fluorescência de norfloxacin em presença de SDS. Como a norfloxacin se apresenta em diferentes formas, dependendo do pH, apresentaremos os diferentes resultados para cada forma: catiônica, em pH 4,0, zwitteriônica, pH 7,4 e aniônica, pH 10,8. Em seguida apresentaremos o resultado de uma titulação em pH de NX em presença micelas de SDS em concentração fixa.

4.1.1 pH 4,0

As Figuras 4.1 e 4.2 apresentam, respectivamente, os espectros de absorção e fluorescência de NX em tampão pH 4,0, em presença de diferentes concentrações de SDS. O espectro de absorção apresenta um leve deslocamento do pico em 276 nm para 280 nm entre as concentrações de SDS de 1 e 3 mmol.L⁻¹. Os espectros de emissão de fluorescência apresentam duas fases bem distintas: a primeira ocorre em baixas concentrações de SDS e provoca uma pequena redução do rendimento quântico, e cessa em concentração de SDS ao redor de 1,5 mmol.L⁻¹. A segunda fase é caracterizada por um deslocamento hipsocrômico da fluorescência, de 440 nm a 432 nm, e um aumento significativo do rendimento quântico. Esse efeito atinge saturação ao redor de 8 a 10 mmol.L⁻¹ de SDS.

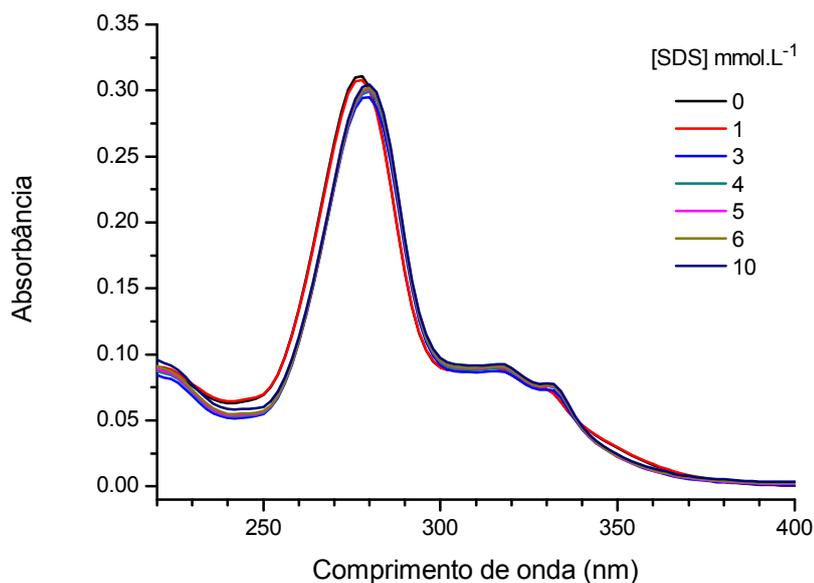


Figura 4.1. Espectros de absorção da NX em solução aquosa (tampão universal pH 4,0) e o efeito da titulação de SDS. Concentração da NX: $8 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

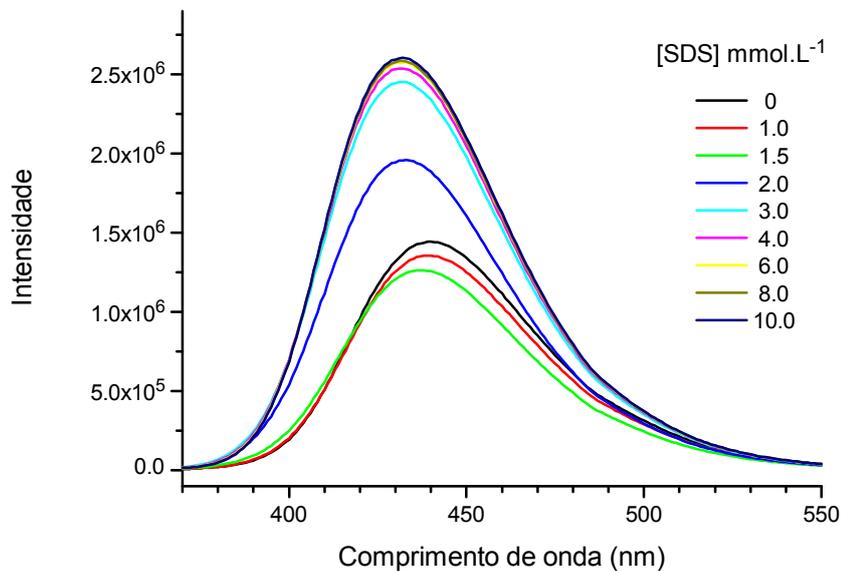


Figura 4.2. Espectros de fluorescência da NX em solução aquosa (tampão universal pH 4,0) e o efeito da titulação com SDS. Concentração da NX: $8 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Excitação em 318 nm.

A CMC de um detergente pode ser detectada por uma sonda fluorescente, uma vez que a formação de micela provoca uma mudança abrupta no espectro de emissão, como explicitado na Seção 3.2. Tal mudança ocorre numa concentração de SDS acima de $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$. Portanto, há um indício de que a CMC está por

volta dessa concentração. No entanto, a CMC de SDS em água é em torno de 9 mmol.L^{-1} (Mohajeri et al., 2012). Apesar de a força iônica do tampão alterar a CMC, não é esperada uma diminuição tão pronunciada, sugerindo que há interação entre NX e SDS na fase pré-micelar, que facilita a formação de micelas e faz com que a CMC de SDS diminua.

Torna-se então possível entender as modificações nos espectros como resultado da interação com SDS em fases diferentes: uma pré-micelar, na qual NX interage com os monômeros de SDS, facilitando a formação de micelas, e outra na qual as moléculas de NX estão ligadas às micelas, apresentando maior rendimento quântico. Como o grupo amina apresenta-se protonado, ele se localiza na superfície da micela, interagindo fortemente com as cabeças polares negativas das moléculas de SDS.

A Figura 4.3 apresenta a variação da fluorescência de NX, em 432 nm, em função da concentração de SDS

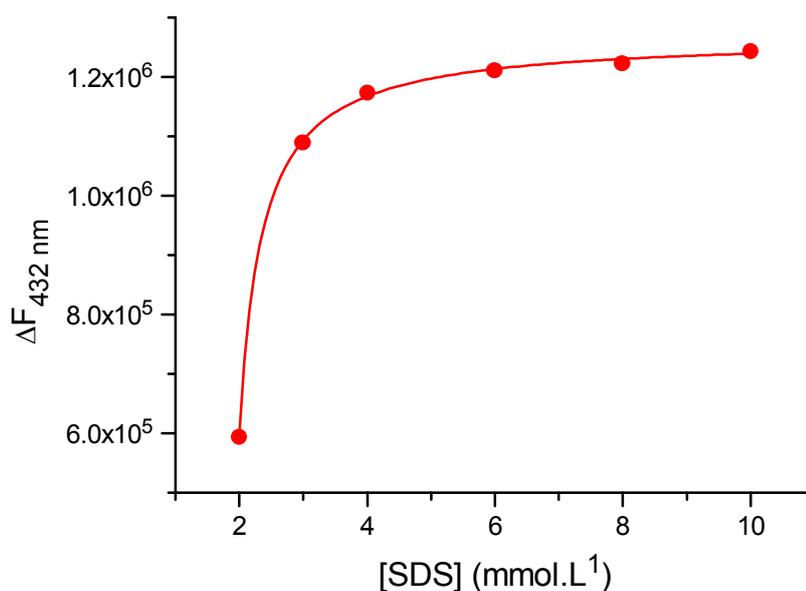


Figura 4.3. Variação da fluorescência da NX em 432 nm em solução aquosa (tampão universal pH 4,0) como função da concentração de SDS.

Os pontos experimentais foram ajustados pela equação (3.1), que descreve um modelo de dois estados, NX foi da micela ou na fase micelar, associada às micelas de SDS. Tal modelo não inclui modificações na fase pré-micelar, que foram pequenas, mas supõe apenas NX foi ou dentro de micelas e, por isso, os pontos correspondentes às intensidades de fluorescência antes da transição

(concentrações abaixo da CMC, iguais ou inferiores a $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$), foram desconsiderados para o ajuste. Dessa maneira, foi obtida uma constante de associação a micelas, $K_b = (5,4 \pm 0,4) \cdot 10^3 \text{ L.mol}^{-1}$ e uma CMC = $(1,83 \pm 0,01) \text{ mmol.L}^{-1}$ para o SDS em presença de NX. A mudança brusca do espectro de emissão se deve justamente à formação de micelas.

Durante a titulação com o SDS foi analisado o decaimento da fluorescência. Uma rápida análise da Figura 4.4 mostra que há um repentino aumento no tempo de vida quando a concentração do surfactante passa de 1 a 3 mmol.L^{-1} . Sustentando a hipótese anterior, que as variações bruscas nas propriedades físicas da NX se devam à formação das micelas de SDS, encontra-se o tempo de vida de NX associada às micelas. Ademais, a interação com os monômeros de SDS não alterou o tempo de vida da NX.

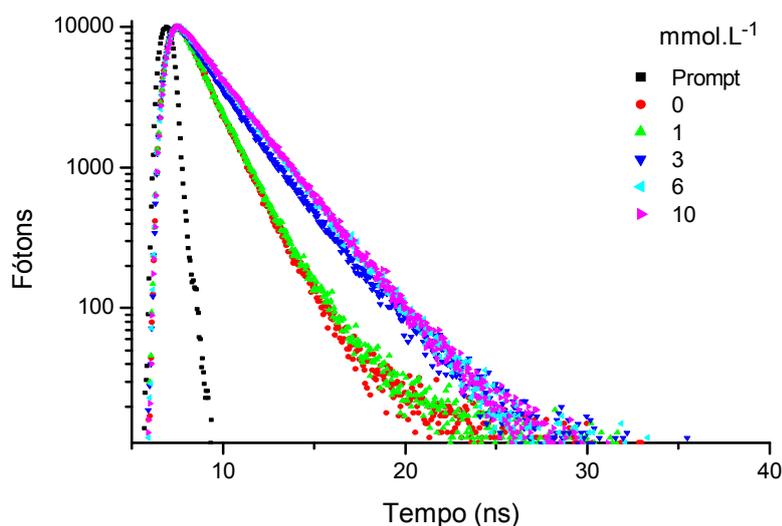


Figura 4.4. Curvas de decaimento de fluorescência da NX ($8 \mu\text{M}$) em solução aquosa ($\text{pH} = 4,0$). Excitação em 330 nm e emissão em 432 nm .

Utilizou-se uma análise global das curvas de decaimento, onde foi possível encontrar dois tempos de vida que ajustaram todos os decaimentos, contribuindo com diferentes percentagens segundo a concentração do surfactante. Foi identificado o tempo de vida $\tau_1 = 1,48 \text{ ns}$, como correspondente ao tempo de vida dos íons de NX em fase aquosa (solução tampão universal $\text{pH} 4,0$) e um tempo de vida mais longo, $\tau_2 = 2,75 \text{ ns}$, como correspondente a NX na fase micelar.

A Figura 4.5 mostra como as contribuições relativas desses dois tempos de vida variam com o aumento da concentração de SDS. Ajustando-se a curva

segundo o modelo de Boltzmann, equação (3.2), foi possível identificar o ponto de inflexão da sigmoide como $(1,9 \pm 0,1) \text{ mmol.L}^{-1}$. Esse valor pode ser tomado como a CMC, muito parecido com o valor encontrado a partir da fluorescência estacionária.

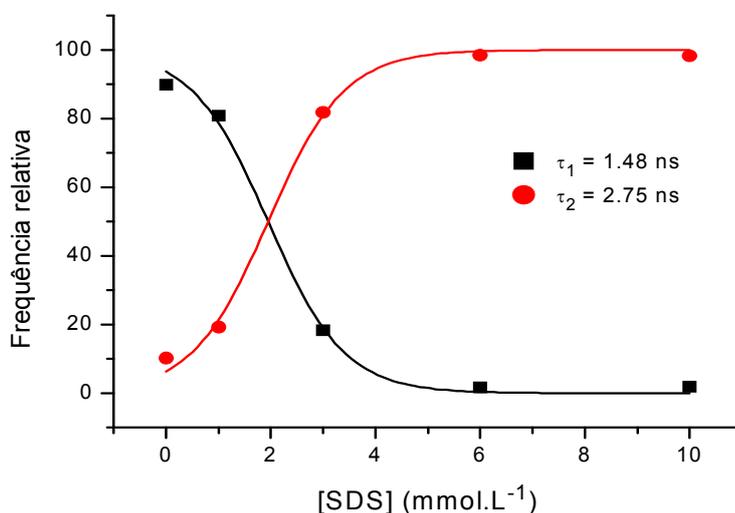


Figura 4.5. Variação da contribuição relativa dos tempos de vida em função da concentração de SDS (tampão universal pH 4,0).

Os espectros de absorção e de fluorescência das fluorquinolonas são extremamente sensíveis ao seu estado de carga (Luiz 2009, Mohr e Monti, 2002). Como o espectro de absorção tem uma variação muito sutil na presença de SDS, é de se inferir que o equilíbrio iônico da NX em pH 4,0 não foi alterado pela associação com as micelas de SDS, de maneira que a NX segue em sua forma catiônica, com o grupo ácido protonado. Segundo essa ideia, a região amina está na superfície da micela, uma vez que seria termodinamicamente desfavorável ter uma carga elétrica num meio apolar. Pela mesma razão, possivelmente a região do grupo funcional carboxila se encontra penetrando mais na micela, visto que o mesmo é vizinho à região mais hidrofóbica desse antibiótico e nesse pH está neutralizado.

4.1.2 pH 7,4

A Fig. 4.6 apresenta os espectros de absorção da norfloxacin em presença de concentrações crescentes de SDS. Em baixas concentrações de SDS ($[\text{SDS}] < 2,7 \text{ mmol.L}^{-1}$) praticamente não há variação no espectro de absorção. Entre 2,7 e

$3,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, há uma variação intensa e abrupta, levando o pico de absorção de 272 para 280 nm e uma redução nas duas bandas absorção em 323 e 334 nm, com deslocamento hipsocrômico.

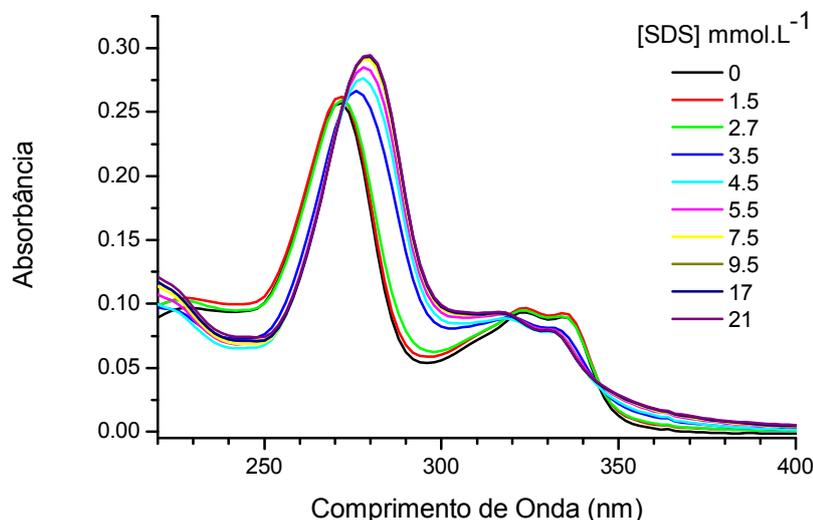


Figura 4.6. Espectro de absorção da NX em solução aquosa (tampão universal pH 7.4) e o efeito da titulação de SDS. Concentração da NX: $8 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

O espectro de absorção apresenta três pontos isobésticos, em 273, 318 e em 345 nm. A presença desses pontos sustenta uma hipótese de transição de fase entre duas espécies e, ademais, a mudança brusca no espectro pode estar relacionada com o processo de micelização. Ou seja, também em pH 7,4 as mudanças no espectro estão sugerindo que a CMC do SDS esteja se deslocando de $\sim 8 \text{ mmol.L}^{-1}$ (Secção 1.3.1) para concentração menor do que 3 mmol.L^{-1} .

Baixas concentrações de SDS ($< 2,7 \text{ mmol.L}^{-1}$) também alteram pouco o espectro de fluorescência de NX (Figura 4.7), levando a crer que a interação pré-micelar não muda muito suas propriedades. Mas os espectros de fluorescência também evidenciam uma transição de fase quando a NX em solução aquosa (pH 7,4) interage com micelas de SDS. Nesse pH, as moléculas de NX também se distribuem entre dois ambientes distintos, um aquoso, no qual NX interage fracamente com os monômeros de SDS, e um micelar. A presença de um ponto isoemissivo em 406 nm, para concentrações de SDS acima de $2,7 \text{ mmol.L}^{-1}$, sustenta a hipótese da transição entre duas espécies, para concentrações acima da CMC.

Na fase aquosa ($[SDS] < 2,7 \text{ mmol.L}^{-1}$) NX se caracteriza por um pico de emissão em 409 nm e na fase micelar ($[SDS] > 2,7 \text{ mmol.L}^{-1}$) há um deslocamento batocrômico da emissão, para 432 nm (Fig. 4.7). Através desse deslocamento, relacionado com a formação de micelas, é possível novamente perceber que as interações entre monômeros de SDS e NX estão reduzindo a CMC do SDS. Ademais, o aumento do rendimento quântico cessa ao redor de 20 mmol.L^{-1} .

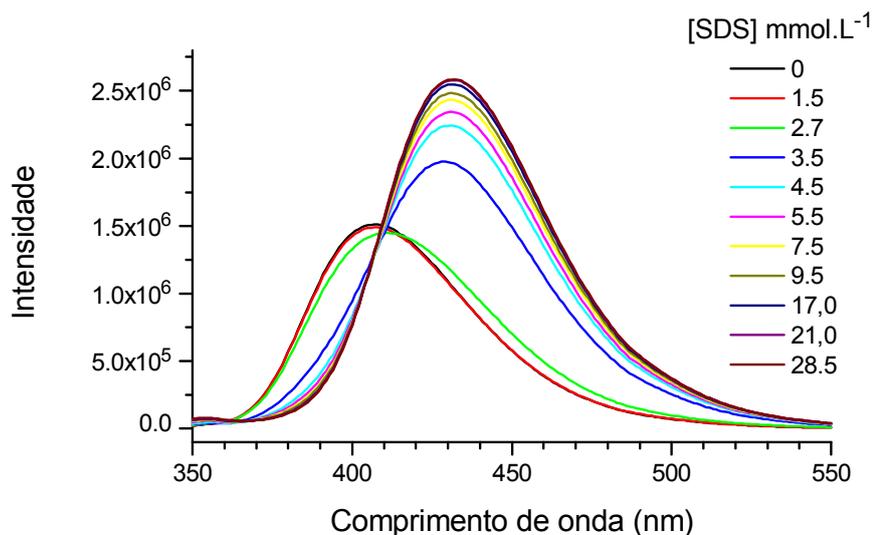


Figura 4.7. Espectro de fluorescência da NX em solução aquosa (tampão universal pH 7.4) e o efeito da titulação de SDS. Concentração da NX: $8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Excitação em 318nm..

A variação da fluorescência em 406 nm foi selecionada para estudar as interações pré-micelares (Fig. 4.8 a), pois a mesma é sensível a baixas concentrações de surfactante e indiferente a concentrações acima de $4,0 \text{ mmol.L}^{-1}$. Esse gráfico sugere uma CMC de cerca de $3,0 \text{ mmol.L}^{-1}$.

O gráfico da Figura 4.8 (b), da variação de fluorescência de NX em 432 nm em função da concentração de SDS, corresponde ao efeito da associação com micelas, já que só acima da CMC há variação significativa nesse comprimento de onda (ver Fig. 4.7). Portanto, somente os pontos acima da CMC foram ajustados com a equação (3.1). Utilizou-se o modelo de dois estados (Materiais e Métodos) e encontrou-se uma $\text{CMC} = 2,75 \text{ mmol.L}^{-1}$ e uma constante de associação $K_b = (1,68 \pm 0,04) \cdot 10^3 \text{ L.mol}^{-1}$.

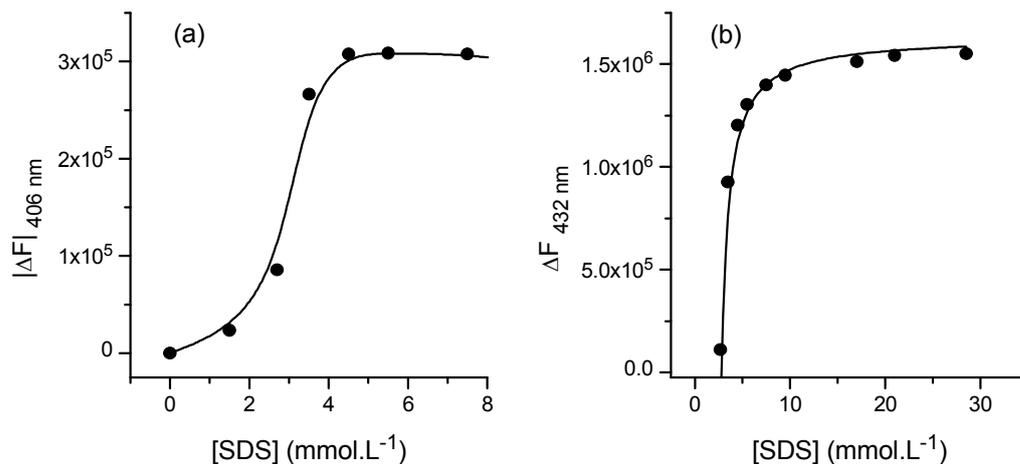


Figura 4.8. Variação da fluorescência da NX em (a) 406 nm e em (b) 432 nm, em solução aquosa (tampão universal pH 7,4) como função da concentração de SDS.

Observa-se que a constante de associação de NX catiônica às micelas de SDS (pH 4,0) é cerca de três vezes maior do que a de NX zwitteriônica.

O decaimento da fluorescência (Fig. 4.9) mostra que o tempo de vida da NX em sua fase aquosa (pH = 7,4) passa de 1,24 para 2,75 ns ao associar-se às micelas de SDS. Este último é o mesmo tempo de vida encontrado quando a NX está completamente incorporada às micelas de SDS em solução aquosa de pH 4,0. Este fato indica que a estrutura da NX na fase micelar independe do pH externo, pelo menos na faixa entre 4,0 e 7,4.

Através da análise global pode-se perceber que esses dois tempos de vida, $\tau_1 = 1,24 \text{ ns}$ e $\tau_2 = 2,75 \text{ ns}$, ajustam todos os decaimentos. A variação de suas contribuições relativas como função da concentração de SDS está apresentada na Figura 4.10. A equação de Boltzmann ajustou os dados e, desse modo, obteve-se a $\text{CMC} = (2,61 \pm 0,01) \text{ mmol.L}^{-1}$ (ver Materiais e Métodos).

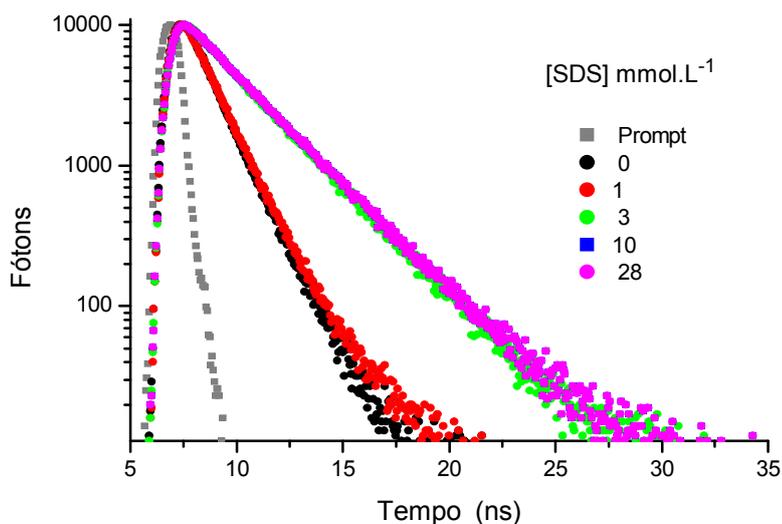


Figura 4.9. Efeito da titulação de SDS no decaimento de fluorescência. Excitação em 330 nm e Emissão em 432nm.

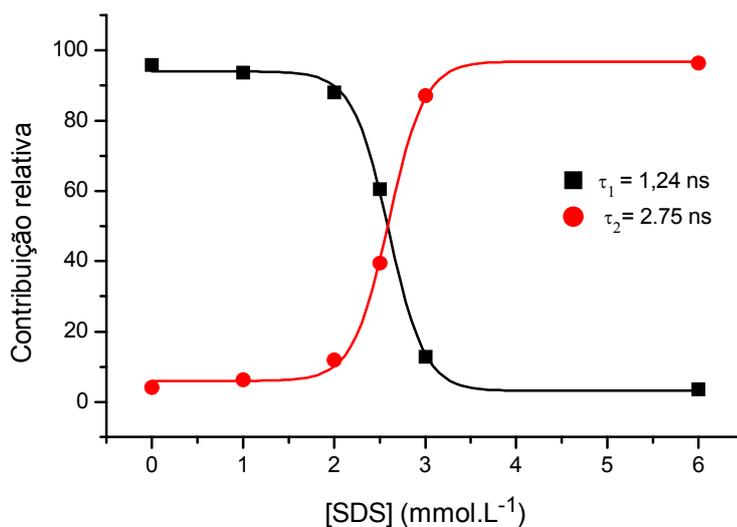


Figura 4.10. Efeito da titulação com SDS nas contribuições relativas dos tempos de vida. Excitação em 330 nm e emissão em 432 nm.

As Figuras 4.11 e 4.12 apresentam uma comparação entre os resultados de NX em pH 4,0 e 7,4 em ausência e em presença de concentração saturante de SDS. O fato de os espectros de absorção e emissão, assim como o decaimento da fluorescência serem rigorosamente iguais na presença de micelas, implica que a estrutura da NX incorporada às micelas de SDS é bastante similar, independente do pH externo. Ou seja, como proposto na Seção 4.1.1, a NX estaria com seu grupamento amina catiônico na superfície da micela e com o heterociclo que

contém o grupo carboxil neutralizado penetrando na fase hidrofóbica. No entanto, em pH 7,4 a carboxila estaria ionizada. Então, conclui-se que deve estar havendo protonação da carboxila devido ao aumento da concentração de íons H_3O^+ na superfície das micelas (diminuição do pH local), causado pela distribuição de cargas negativas das moléculas de SDS.

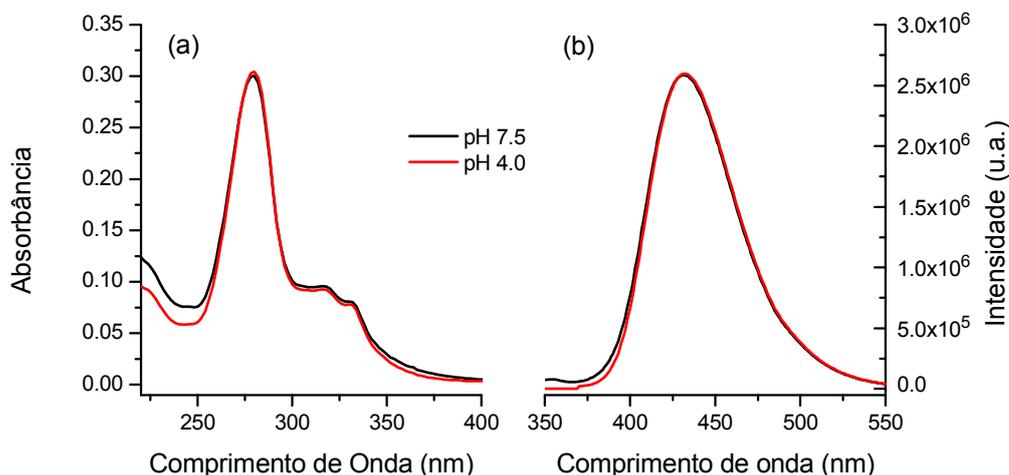


Figura 4.11. Espectros de absorção (a) e fluorescência (b) da norfloxacina na fase micelar em pH 7,4 (preto) e 4,0 (vermelho) [SDS] 21mMem pH 7,4 e 10 mM em pH 4,0.

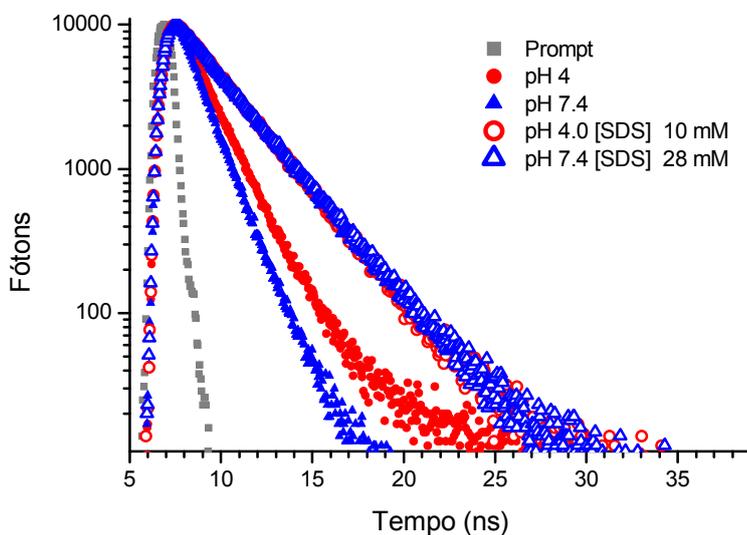


Figura 4.12. Decaimento da fluorescência da NX em solução aquosa, tampão universal: pH 4,0 e pH 7,4, com e sem SDS (ver legenda no gráfico). Concentração de SDS igual a 10 mmol.L⁻¹ em pH 4,0 e 28,5 mmol.L⁻¹ em pH 7,4.

Sortino (2005) percebeu que em situações saturantes de SDS em solução aquosa (tampão fosfato pH 7,4) o espectro de absorção do conjunto NX-SDS é

muito similar ao da forma catiônica da NX, o que o levou a propor que, quando em micelas de SDS, a NX está protonada. Entretanto, o que ele não percebeu, nem mesmo estudou, foi que apesar da pouca alteração no espectro de absorção da NX protonada em ausência e presença de SDS, houve uma grande variação no espectro de emissão, bem como no decaimento da fluorescência.

Na realidade, o que encontramos foi que, dentro das micelas de SDS, os espectros de absorção e fluorescência da NX, bem como o seu tempo de vida (2,75 ns), foram rigorosamente os mesmos em diferentes pHs, indicando que a NX dentro da micela não “sente” o meio externo, ao menos na faixa de pH entre 4,0 e 7,4. A estrutura da NX quando nas micelas de SDS não depende do pH, sugerindo que o grupo amina protonado está na superfície da micela e o grupo carboxila neutralizado, no interior da micela. Esta neutralização do grupo ácido se dá, provavelmente, por conta da alta concentração de hidrônio na superfície das micelas, como mencionado no parágrafo anterior, o que a torna uma microrregião de baixo pH.

A comparação das constantes de associação encontradas neste trabalho com as encontradas por Sortino (2005) se faz difícil, visto que o autor não indicou qual o número de agregação e a CMC utilizados para o ajuste dos pontos experimentais, como também não fez referência alguma a interações pré-micelares. Caso seja utilizado o número de agregação fornecido pela Sigma-Aldrich $N = 62$, é possível calcular que o valor da constante de associação encontrado nesta dissertação é 1,8 vezes maior do que o de Sortino.

4.1.3 pH 10,8

O espectro de absorção da NX quando titulada com SDS em solução tampão de pH 10,8 (Fig. 4.13) não sofre grandes alterações, sugerindo que nesse pH a NX interage fracamente com as micelas de SDS.

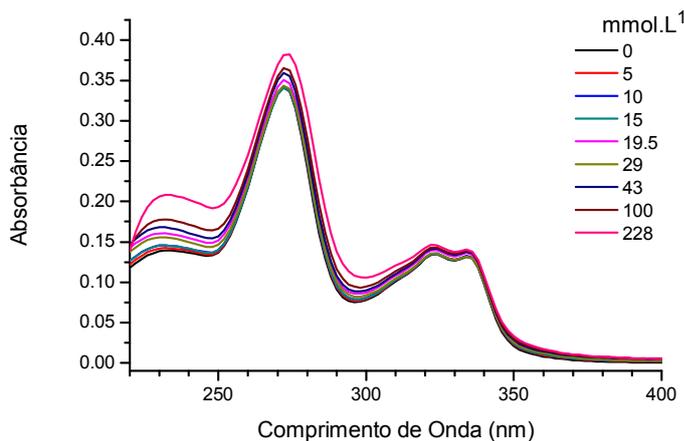


Figura 4.13. Espectro de absorção da NX em solução aquosa (tampão universal pH 10,8) e o efeito da titulação com SDS. Concentração de NX: $8 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

A intensidade de fluorescência das fluorquinolonas é significativamente afetada pelo pH, e o rendimento quântico é altamente reduzido em pHs acima de 8, já que a forma aniônica da NX não é fluorescente (Casajeros, 2009; Mohr e Monti, 2002). A NX em pH 10,8 apresenta um rendimento quântico muito baixo, quando comparado com os rendimentos em pH 7,4 e 4,0, e um pico de emissão em 416 nm (Fig 4.14). A titulação com SDS provoca um aumento na emissão de fluorescência e um deslocamento para o azul, chegando a 407 nm, que é o pico de emissão da NX em sua forma zwitteriônica.

Os efeitos provocados pelo aumento da concentração de SDS (incremento no rendimento quântico e deslocamento para o azul) não saturaram mesmo em concentrações tão altas quanto 288 mmol.L^{-1} (ver Fig. 4.14). O espectro de fluorescência foi pouco sensível a baixas concentrações do detergente.

O modelo de dois estados utilizado para obter a constante de associação requer mais pontos perto da saturação do que os da Fig. 4.14 (b) para que o erro no valor de K_b não seja grande. Ainda assim, foi possível obter um valor aproximado para K_b ($5 \pm 1 \text{ L.mol}^{-1}$), muito menor do que em pH 4,0 e 7,4.

A baixa associação de NX com micelas de SDS em pH alto está de acordo com o fato de se apresentar na forma aniônica nesse pH e, por conseguinte, sofrer repulsão eletrostática das micelas de SDS que também são carregadas negativamente. Mas o fato de haver alguma associação indica que, apesar da repulsão eletrostática, a interação hidrofóbica da NX aniônica a leva a se associar à micela, ainda que com baixa constante de associação.

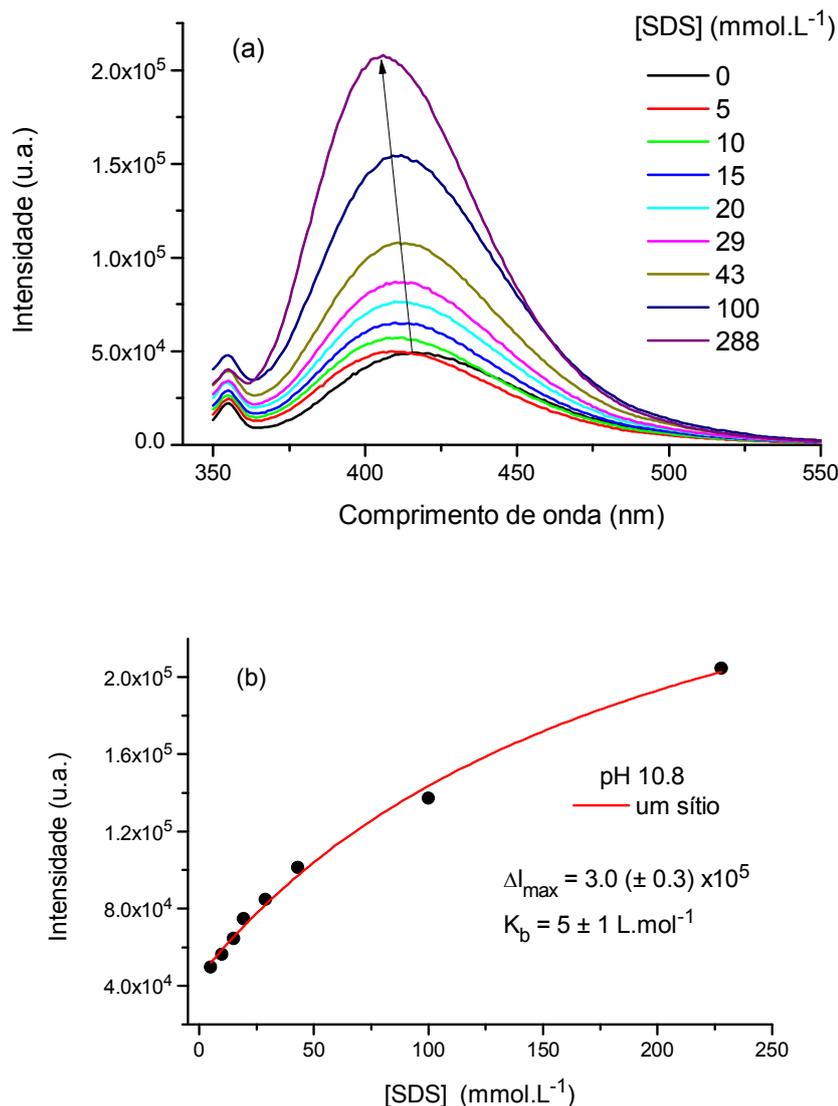


Figura 4.14.(a) Espectros de fluorescência da NX em solução aquosa (tampão universal pH 10,8) e o efeito da titulação de SDS. Concentração da NX: $8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Excitação em 318nm.(b) Fluorescência em 407 nm em função da concentração de SDS. A linha contínua é o resultado do fit com o modelo de 2 estados (um sítio de ligação).

A Fig. 4.15 apresenta o decaimento da fluorescência de NX em pH 10,8 e em concentrações crescentes de SDS. Observa-se que, em tempos pequenos, o coeficiente angular da curva praticamente não varia, mas em tempos maiores há uma contribuição crescente de um tempo de vida mais longo.

Foram obtidas, então, curvas de decaimento nas mesmas condições, mas usando apenas a solução de SDS. Observou-se que esse tempo de vida mais longo aparece em ausência de NX e se deve, portanto, a impureza. Em pH 10,8 essa contribuição se torna relevante pois a fluorescência da NX é muito baixa.

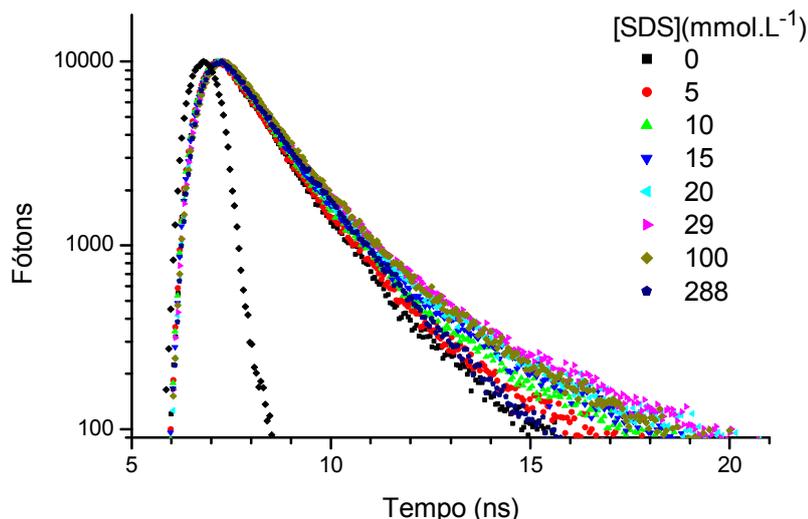


Figura 4.15. Decaimento da fluorescência de NX em solução aquosa tampão universal pH 10,8 e o efeito da titulação com SDS.

A Tabela 4.2 mostra os resultados da análise dos decaimentos usando dois tempos de vida.

Tabela 4.2

[SDS] (mmol.L ⁻¹)	τ_1 (ns)	F ₁ (%)	τ_2 (ns)	F ₂ (%)	χ^2
0	1,19	78,6	3,31	21,4	1,18
10	1,19	61,6	3,58	38,4	1,23
19,5	1,21	62,7	3,90	37,3	1,21
43	1,25	60,7	4,36	39,3	1,01
100	1,25	59,2	3,69	40,6	1,14
288	1,27	80,9	3,00	19,1	1,10

Em pH 10,8 a NX apresentou dois tempos de vida, um de 1,2 ns (igual ao de NX zwitteriônica) e outro mais longo, de 3,3 ns, com uma contribuição relativa menor (provavelmente devido a impureza). Em concentrações de SDS mais altas, o tempo de vida τ_1 aumenta um pouco, até 1,27 ns. Em baixas concentrações de SDS as moléculas de NX são repelidas pela interação eletrostática, no entanto o incremento da concentração de micelas de SDS aumenta a probabilidade de NX se associar, e sofrer ação da microrregião de pH mais baixo, tendo maior probabilidade de assumir a forma zwitteriônica, tornando-se fluorescente.

4.1.4 Titulação em pH de NX em presença de micelas de SDS

Observou-se nas seções 4.1.1 e 4.1.2 que concentrações de SDS da ordem de 25 mmol.L^{-1} são saturantes para associação de NX tanto em pH 4.0 como em 7.5. Nessas concentrações apenas a NX aniônica não se associa. Foi então realizada uma titulação em pH em concentração fixa de NX, $8 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, e de SDS, 25 mmol.L^{-1} . As Figuras 4.16 e 4.17 mostram os espectros de absorção UV-Vis e de fluorescência nos diferentes pHs. Observa-se que, com o decréscimo de pH, tanto o espectro de absorção como o de fluorescência sofrem modificações que tendem aos respectivos espectros da espécie catiônica incorporada às micelas. De fato, com o decréscimo do pH o grupo amina torna-se catiônico e cada vez mais moléculas de NX na forma catiônica se incorporam às micelas. Na inserção da Fig. 4.17 observa-se a variação da intensidade de fluorescência em 430 nm, característica de NX em micelas de SDS, em função do pH. A curva contínua é o ajuste por mínimos quadrados usando a seguinte equação (Luiz et al., 2011):

$$I = \frac{I_1 \cdot 10^{pK} + I_2 \cdot 10^{pH}}{10^{pK} + 10^{pH}} \quad (4.1)$$

Observa-se que o valor de pK_2 , correspondente à protonação da amina, foi deslocado de 8.6 para 9,1 na presença de 25 mM de SDS. Nessa concentração de SDS a forma zwitteriônica da NX praticamente não ocorre, já que a associação com as micelas aniônicas estabiliza a forma catiônica da NX.

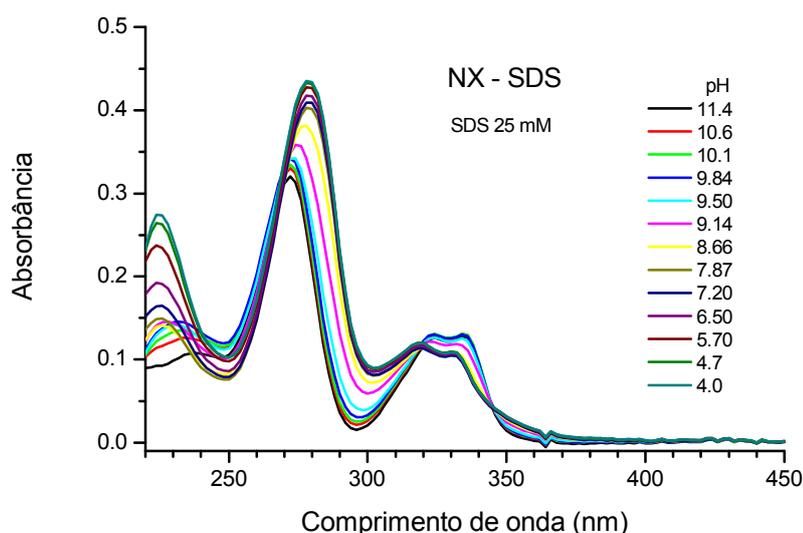


Figura 4.16. Espectros de absorção UV-Vis de NX em tampão universal em presença de SDS, 25 mmol.L^{-1} , em diferentes valores de pH.

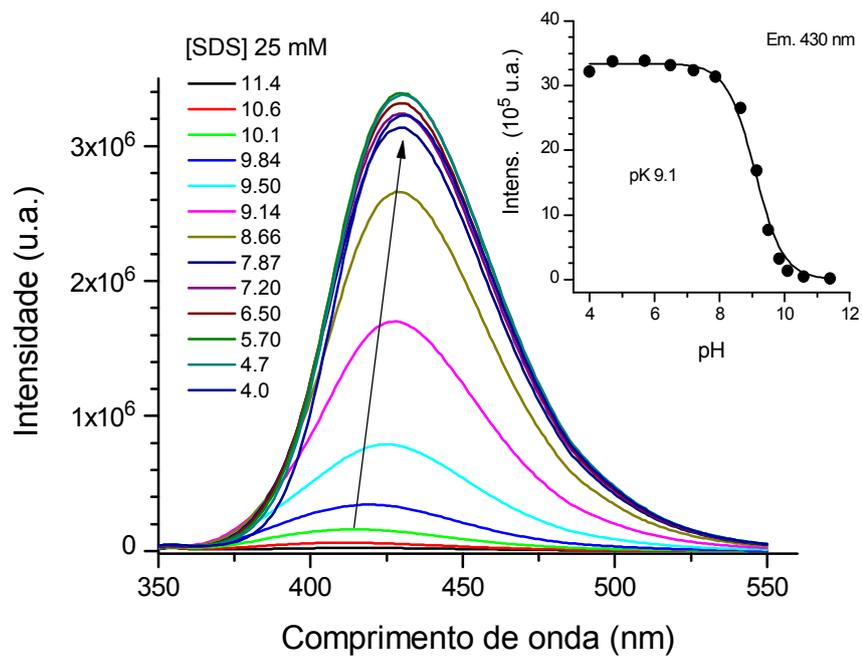


Figura 4.17. Espectros de fluorescência de NX em tampão universal em presença de SDS, 25 mmol.L^{-1} , em diferentes valores de pH.

4.2

Interação de Norfloxacin com micelas de CTAB

Em solução aquosa, o íon Br^+ de CTAB sofre uma dissociação, e a micela fica com uma carga líquida positiva.

Os espectros ópticos de NX não sofreram qualquer modificação quando titulada com o CTAB em concentrações abaixo da CMC, $\sim 1 \text{ mmol.L}^{-1}$.

4.2.1 pH 4,0

Em pH 4,0 a forma mais comum da NX é a catiônica e as micelas de CTAB também possuem carga líquida superficial positiva. Portanto há uma repulsão eletrostática entre os íons de NX e as cabeças de carregadas do CTAB. Como era de se esperar os espectros ópticos não sofreram nenhuma alteração significativa, indicando que neste caso a interação eletrostática é dominante sobre as interações hidrofóbicas (Fig. 4.18) e não há associação.

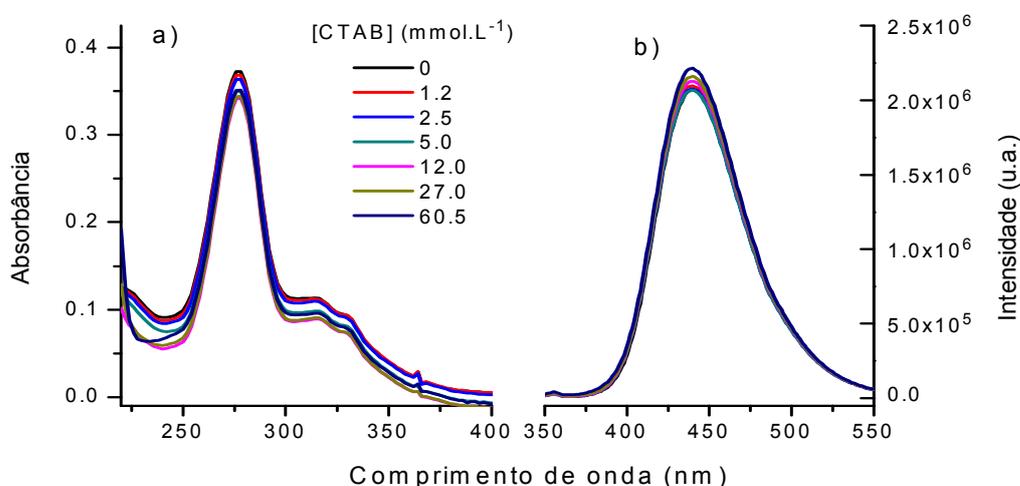


Figura 4.18. Espectros ópticos da NX e o efeito da titulação com CTAB. a) Espectro de absorção. b) Espectro de fluorescência. NX em solução tampão universal pH 4,0. $\lambda_{\text{exc}} = 318 \text{ nm}$.

O decaimento da fluorescência também foi investigado durante a titulação com CTAB (Fig. 4.19). Mesmo em altas concentrações de CTAB ($\sim 60.5 \text{ mmol.L}^{-1}$) o tempo de vida de NX não foi alterado, continuando igual ao de NX em solução aquosa pH 4,0, $\tau_1 = 1,48 \text{ ns}$, ratificando o argumento inicial de que a repulsão eletrostática é dominante e impede que NX se associe às micelas de CTAB.

Conclui-se que a forma catiônica de NX não se associa a micelas de CTAB.

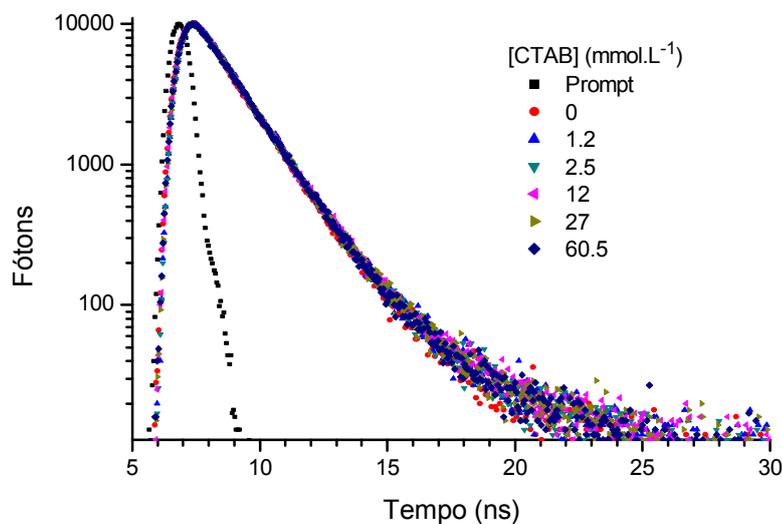


Figura 4.19. Decaimento da fluorescência da NX em solução aquosa (tampão universal pH 4,0) e o efeito da titulação de CTAB. λ_{exc} = 330 nm e $\lambda_{emissão}$ = 440 nm.

4.2.2 pH 7,4

A interação entre os zwitteríons de NX e as micelas de CTAB foi investigada. O espectro de absorção da NX em titulação com CTAB (Fig. 4.20) não apresenta alterações significativas.

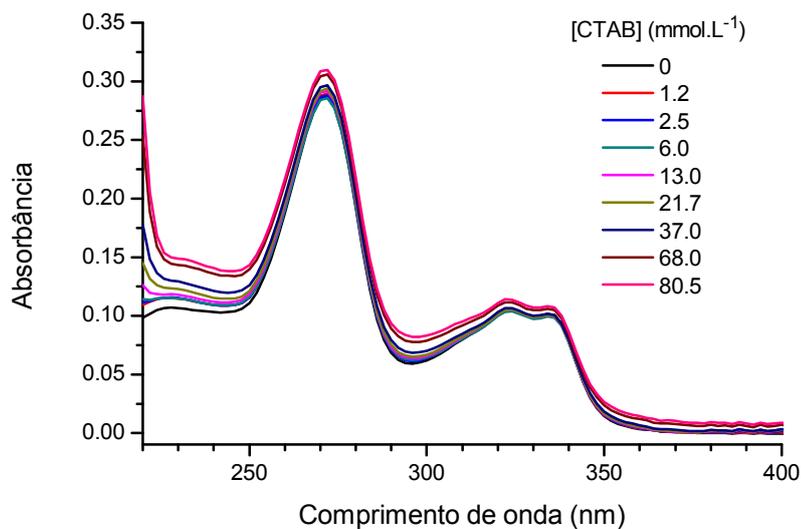


Figura 4.20. Espectro de absorção da NX em solução aquosa (tampão universal pH 7,4) e o efeito da titulação com SDS.

Os espectros de absorção foram corrigidos pelo fator de diluição. Há contribuição em 220 nm, mas é devido exclusivamente ao surfactante e não a um efeito do surfactante em NX.

Os espectros de emissão de NX titulada com CTAB (Fig 4.21) apresentam supressão. Essa diminuição na intensidade de fluorescência poderia ser devida à supressão promovida por íons de bromo, que se dissociam do surfactante quando este se encontra em solução aquosa. No entanto, não se observa variação no tempo de vida (Fig. 4.22), indicando que não há a supressão dinâmica que seria causada por íons Br^- em solução. A titulação com CTAB não foi capaz de alterar o tempo de vida (Fig. 4.22), que continua sendo o mesmo da NX em solução aquosa pH 7,4, $\tau_1 = 1,24$ ns.

Uma explicação plausível para a supressão observada é que, ao se localizar na superfície da micela de CTAB, as moléculas de NX encontrem uma região de pH mais alto e, pelo menos parte delas, tenham o grupo amina protonado. Como nessa forma aniônica as moléculas de NX não são fluorescentes, isso explicaria na diminuição da fluorescência.

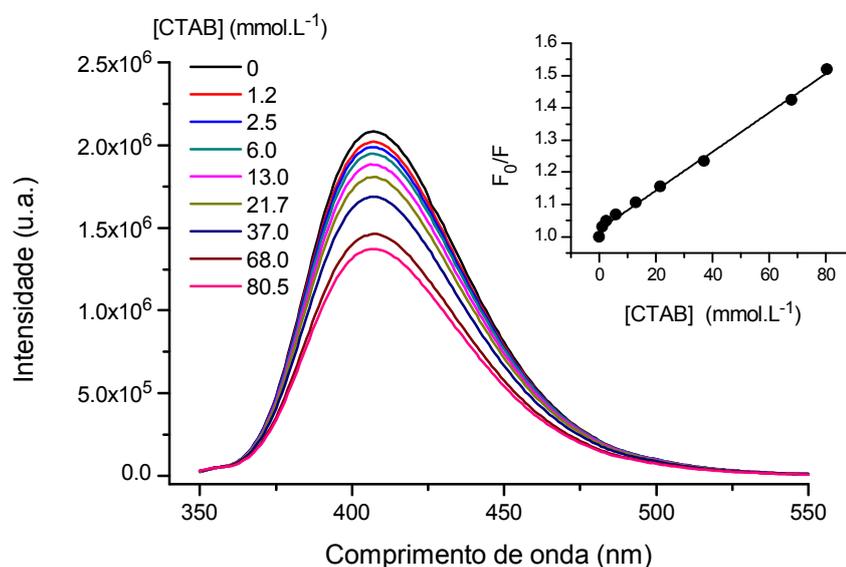


Figura 4.21. Espectro de fluorescência. NX em solução aquosa (tampão universal pH 7,4). $\lambda_{\text{exc}} = 318$ nm. Inserção: Gráfico de Stern-Volmer, $\lambda = 409$ nm. Linha reta é o ajuste linear com r^2 igual a 0,995.

O gráfico de Stern-Volmer é apresentado na inserção da Fig. 4.21. Os pontos foram ajustados por uma reta com uma constante de Stern-Volmer igual a $K_{\text{SV}} = (6,0 \pm 0,1) \text{ L.mol}^{-1}$. O caráter linear sugere também duas classes de moléculas: fluorescentes, em solução aquosa longe das micelas, e não

fluorescentes, localizadas na superfície da micela e com o grupo amina protonado. É importante observar que a constante de Stern-Volmer é pequena, considerando-se supressão estática, indicando que a constante de associação é pequena (que é a própria K_{SV} , nesse modelo).

Conclui-se que a NX zwitteriônica se associa fracamente a micelas de CTAB, com constante de associação de apenas $6,0 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$.

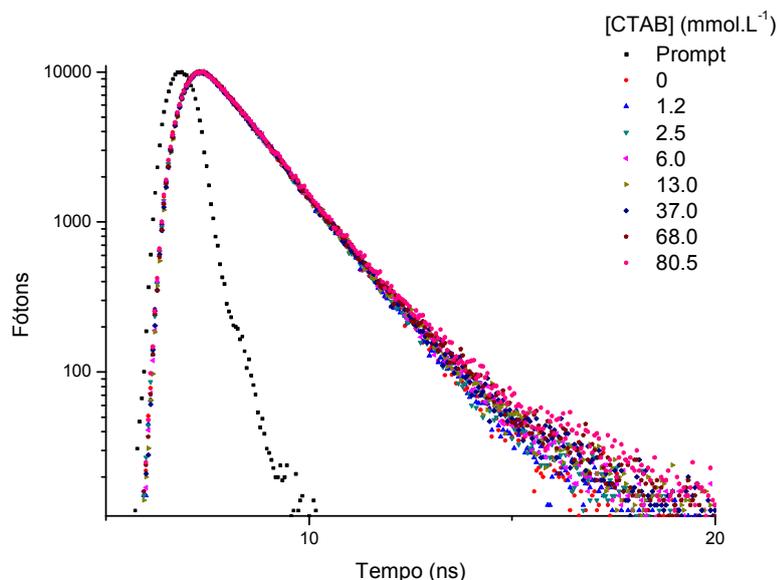


Figura 4.22. Decaimento da fluorescência da NX em solução aquosa (tampão universal pH 7,4). $\lambda_{\text{excitação}} = 330 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 409 \text{ nm}$.

4.2.3 pH 10,8

Neste pH a forma mais comum da NX é a aniônica, o que levaria a prever uma atração eletrostática entre NX e as micelas catiônicas. Era de se esperar que a atração eletrostática entre o grupo carboxil (ionizado neste pH) e as cabeças positivas das micelas de CTAB atraíssem a molécula para superfície da micela, enquanto os anéis policíclicos, por conta das interações hidrofóbicas, tenderiam a ficar para dentro da micela. De maneira, a interação hidrofóbica e a atração eletrostática deveriam manter a molécula de NX intercalada entre as moléculas de surfactante.

O espectro de absorção da NX em titulação com CTAB (Fig. 4.23) apresenta um leve deslocamento para o vermelho, levando a banda de 272 para

276 nm, ademais há uma pequena redução na absorção nesta banda. A região de 318 a 330 nm não sofre praticamente nenhuma alteração. Há um grande espalhamento/absorção em comprimentos de onda abaixo de 250 nm, mas este se deve exclusivamente ao surfactante.

É importante lembrar que na superfície de micelas catiônicas o pH local é aumentado. Então, mesmo que a NX se associe às micelas em pH 10,8, não seria esperado um aumento de fluorescência pois o grupo amina continuaria desprotonado.

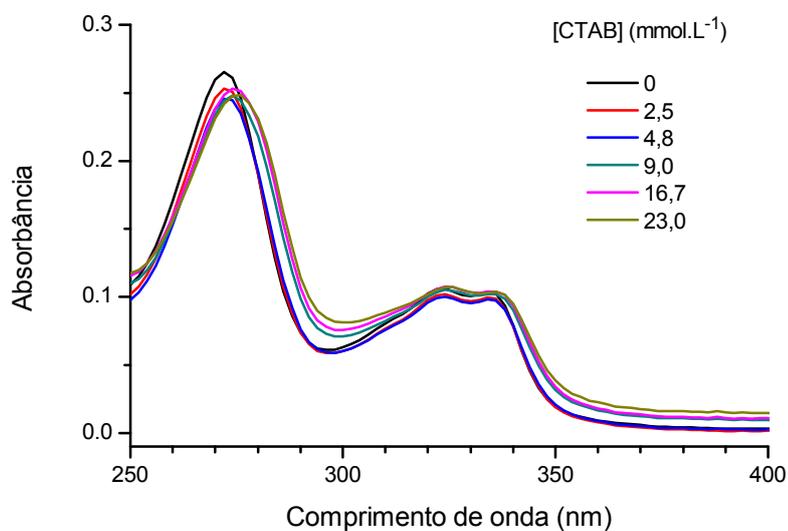


Figura 4.23. Espectro de absorção da NX em solução aquosa (tampão universal pH 10,8) e o efeito da titulação com CTAB.

A NX tem a intensidade de fluorescência aumentada à medida que a concentração de CTAB se torna maior (Fig. 4.24). No entanto, as alterações nos espectros de fluorescência sugerem apenas que algumas moléculas passam à forma zwitteriônica e o gráfico inserido na Fig. 4.24 deixa claro que não há saturação no aumento na intensidade de fluorescência.

Como é possível ver pela Fig. 4.25, o tempo de vida foi alterado apenas pelo aparecimento de uma contribuição ao redor de 4,2 ns, que se deve a impureza no surfactante. Tal impureza tem fluorescência muito baixa e por isso foi imperceptível nos outros pHs. Só o deixa de ser desprezível quando a fluorescência de NX é também bastante reduzida. O tempo de vida de NX continua em 1,17 ns.

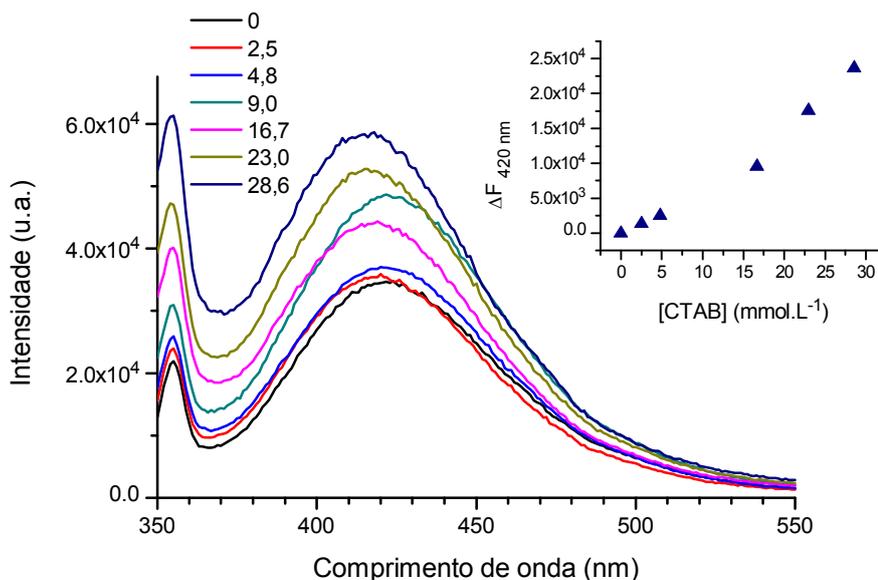


Figura 4.24. Espectro de fluorescência da NX em solução aquosa (tampão universal pH 10,8) e o efeito da titulação com CTAB. Inserção: variação da intensidade de fluorescência em 420 nm como função da concentração de CTAB.

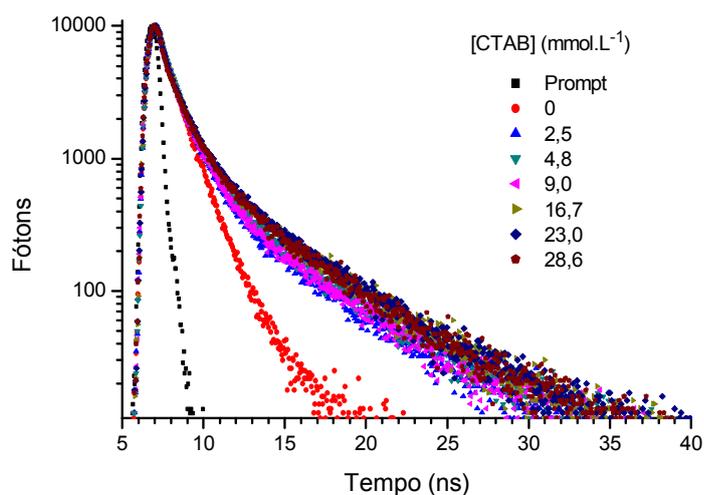


Figura 4.25. Decaimento da fluorescência da NX em solução aquosa (tampão universal pH 10,8) e o efeito da titulação com CTAB. $\lambda_{\text{excitação}} = 330 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 410 \text{ nm}$.

Conclui-se que não é possível através de medidas de fluorescência intrínseca obter a constante de associação de NX aniônica com micelas de CTAB, já que essa espécie não é fluorescente.